

원 지

대식세포에서 산화질소 생성에 대한 當歸 에탄올 추출물의 억제효과

정미영¹, 박희준², 정지행³, 김진용¹, 강전모^{1,2}, 이나경^{1,2}, 임사비나^{1,2}

¹경희대학교 WHO 전통의학연구협력센터 동서의학연구소, ²경희대학교 한의과대학 경혈학교실, ³정지행리듬케어(주)

Inhibitory Effect of *Angelica gigas* Nakai Extract on Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Cells

Mi-young Jeong¹, Hi-joon Park², Jee-haeng Jeong³, Jin-young Kim¹,
Jun-mo Kang^{1,2}, Na-kyeong Lee^{1,2}, Sabina Lim^{1,2}

¹WHO Collaborating Center for Traditional Medicine, East-West Medical Research Institute
²Kyunghee University, Department of Meridian and Acupuncture, College of Eastern Medicine
³Kyunghee University, Jeong Jeehaeng Rhythmcare Co. Ltd

Objective : The *Angelica gigas* Nakai ethanol extract (AGE) was investigated to compare nitric oxide (NO) production and NF- κ B activity from RAW 264.7 cells, since NO and nuclear factor- κ B (NF- κ B) have been shown to be factors implicated in inflammatory disease.

Method : AGE was prepared by extracting medicinal herb with 70% (v/v) ethanol solution. We investigated production of nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by ARE in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. We also investigated inhibition of LPS-induced activation of NF- κ B on western blot.

Result : LPS-induced RAW 264.7 cells increased NO production and iNOS expression. Upon treatment with AGE, nitrite production was significantly inhibited in a concentration-dependent manner compared to the untreated control. AGE inhibited this LPS-induced iNOS mRNA and protein in a dose-dependent manner. AGE markedly inhibited the expression of iNOS mRNA and protein at a concentration of 100 μ g/ml. LPS-induced RAW 264.7 cells with AGE blocked inhibitory factor- κ Ba degradation.

Conclusion : This study shows that AGE seems to attenuate inflammation through inhibition of NO production and iNOS expression by blockade of NF- κ B activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Key Words : *Angelica gigas* Nakai, RAW 264.7 cells, inflammation, nitric oxide, nuclear factor κ B

- 접수 : 2007년 5월 10일 · 논문심사 : 2007년 5월 11일
- 채택 : 2007년 5월 31일
- 교신저자 : 임사비나, 서울시 동대문구 회기1동, 경희대학교 WHO 전통의학연구협력센터 동서의학연구소
(Tel : 02-961-0324, Fax : 02-961-7831,
E-mail : lims@khu.ac.kr)
- 이 논문은 2005년도 경희대학교 산학협력단 주관 중소기업청의 “산.학.연 공동기술개발 컨소시엄사업”개발과제의 연구비지원에 의하여 연구되었음. (S0507110-A0151058- 25012011)

서 론

當歸는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 *Angelica* 속 식물로서 특이한 방향성 냄새가 있으며 한국에 서는 주로 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)를 사용하고 있다¹⁾. 참당귀는 강원도의 고산지대에서 주로 생산되는 약용식물로서 예부터 진정, 진통, 빈혈 및 월경통, 냉대하증 등의 부인과 질환에 보혈

청혈요약으로 널리 임상에 사용되어왔다²⁾. 지금까지 알려져 있는 참당귀의 성분은 coumarin 계 물질인 decursin, decursinol, nodakenetin, umbelliferon, nodakenin, β -sitosterol 등이다³⁾. 當歸의 약리작용으로는 진통 및 항염증 작용이 알려져 있는데, 當歸의 성분 중 ferulic acid는 carrageenin으로 유도된 부종을 억제하며 acetic acid로 유도된 모세혈관의 투과성 증대를 억제한다⁴⁾. 참당귀에서 분리한 decursin과 polyacetylene성분도 항염작용과 관련성이 있다^{5,6)}.

염증(inflammation)은 상처를 줄 수 있는 자극에 대한 생체의 방어반응으로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애의 5가지 증상이 나타나며, cytokines, prostaglandin E2 (PGE2), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다⁷⁾. 특히 대식세포에서 cytokine, tumor necrosis factor (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor κ B (NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 Nitric Oxide (NO)와 Prostaglandin E2 (PGE2)를 생성하여 염증을 일으킨다^{8,9)}. Nuclear Factor κ B (NF- κ B)는 염증반응, 면역 반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하는 전사인자로 종양형성, 자가 면역질환, 염증질환에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. NF- κ B는 세포질속에 p50과 p65의 heterodimer와 방해 단백질인 I κ B와 함께 불활성 형태로 존재하다 활성 산소종, LPS, cytokine 같은 염증성 자극에 의해 I κ B kinase가 활성화되어 I κ B가 분해 되면, NF- κ B는 활성화된 후 핵으로 이동하여 iNOS와 COX-2 등의 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시켜 염증반응에 관여하는 NO, PGE2의 반응성 물질을 생성하게 하여 염증반응이 일어나게 되며, 이중 NO는 혈관확장 및 조직손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹⁵⁾. NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 NO synthase (NOS)에 의해

L-arginine으로부터 생성되며 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 interferon- γ (IFN- γ) 또는 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응 매개물질의 염증반응 매개물질의 역할을 하게 된다¹⁶⁻²⁰⁾. 다량의 생성된 NO는 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다²¹⁾. 그러므로 iNOS 발현을 억제하여 NO의 생성을 줄인다면 염증성 질환의 치료에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

이상에서 살펴본바와 같이 當歸가 NF- κ B활성을 저하시키고 iNOS의 발현을 억제하여 NO의 생성을 줄일 수 있는지를 평가해서 當歸의 염증성질환 치료기전을 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 당귀 에탄올 추출물 제조

본 실험에서 사용된 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 강원도 평창군 하진면에서 재배한 것으로 서울특별시 동대문구 제기동 소재의 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

참당귀 200 g을 분쇄기로 분쇄한 후, 70% 에탄올 800 ml을 가하여 2회 환류 추출하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축 후 동결건조하여, 참당귀 에탄올 추출물을 제조하였다. 참당귀 에탄올 추출물은 Dimethylsulfoxide(DMSO)에 20 mg/ml로 녹여 실험 시료로 사용하였다.

2. 세포배양

Murine Macrophage cell line인 RAW 264.7세포는 서울대학교 암연구소 한국세포주은행에서 분양받았으며, 10% Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, USA)과 1% antibiotics/antimycotics (100 U/ml of penicillin, 25 μ g/ml of amphotericin

D and 100 µg/ml of strptomycin)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GibcoBRL, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.

3. 세포 생존율

참당귀 에탄올 추출물에 대한 대식세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-1)-

5-(3-carboxymeth-oxypyhenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay 방법으로 분석하였다. 이 assay는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것에 의한다. 1×10⁴ cells로 96well plate에 배양한 세포에 추출물을 농도별로 처리하였다. 48시간 배양 후, Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, U.S.A) 용액을 첨가하고, 4시간 후 micro-ELISA reader를 이용하여 490nm에서 O.D. 값을 측정하였다.

4. NO production의 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System (Promega, co., USA)을 이용하여 측정하였다. 100 mm culture dish에 다양한 농도의 추출물을 전처리하고 30분후 LPS 1 µg/ml를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액만을 회수, 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 배양액 50 µl과 같은 양의 Griess Reagent [1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride]를 섞어주고, 10분간 상온에 정치시킨후, micro-ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.1 M sodium nitric의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액내의 NO 농도를 결정하였다.

5. RT-PCR

100 mm culture dish에 대식세포를 배양한 후

참당귀 추출액을 농도별로 처리하여 30분 배양한 후, LPS (1 µg/ml)를 첨가하여 16시간 배양하였다. 배양 후 Trizol-reagent (Invirogen)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에서 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 합성하고, cDNA를 증폭하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. iNOS; '5-TGG GAA TGG AGA CTG TCC CAG-3' (forward), '5-GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG-3' (reverse); 306bp, β-actin; '5-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3' (forward), '5-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' (reverse); 514bp. 증폭한 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose로 전기영동하여 확인하였다.

6. Western blot

100 mm culture dish에 대식세포를 배양한 후 참당귀 추출액을 농도별로 처리하여 30분 배양한 후, LPS (1 µg/ml)를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음, lysis buffer [50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.2% SDS, 1 mM PMFS, 10 µl/ml aprotinin, 1% Nonidet P-40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 10 mM NaF, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA and 0.5% sodium deoxycholate]를 넣고 cell scraper로 긁어준 후 microtube로 세포를 옮겼다. 30분간 얼음에 정치한 후, 4°C 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 새로운 microtube로 옮겨, Bio-Rad protein assay reagent(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 단백질 정량한 후, 실험에 사용하였다. 단백질 시료를 30 µg으로 하여 12% SDS polyacrylamide gel에서 140v로 1시간동안 전기영동을 하였고, nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)에서 1시간동안 transfer하였다. membrane은

5% (w/v) non-fat dried milk를 넣고 상온에서 1시간 block하였다. 각각의 specific antibodies (iNOS, actin - Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA; IkBa - cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:1000으로 하여 4℃에서 overnight 하고, Tris-buffered saline으로 3회 세척한 뒤, 200 배로 희석한 secondary antibody (immunoglobulin G-horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA))를 넣고 1시간동안 반응 시켰다. protein band를 관찰하기 위하여, enhanced chemiluminescence detection system (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 사용하였다.

7. 통계

모든 측정값은 평균값 ± 표준오차 (Mean ± standard error)로 나타내었으며, oneway - ANOVA 로 통계 검정한 뒤 Newman-Keuls 방법을 사용하여 사후 분석하였다. 유의수준 p < 0.05 이하인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. RAW264.7 세포의 생존에 미치는 영향

대식세포에서 참당귀 에탄올 추출물(AGE)을 농도별로 처리하였을 때의 세포 생존율을 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 AGE가 100 µg/ml일 때까지

지는 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으나, 200 µg/ml 이상의 농도에서는 세포 생존율이 유의성을 갖고 크게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 실험에서 사용한 AGE의 농도는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 최고 농도인 100 µg/ml로 하였다(Fig. 1).

2. RAW264.7 세포의 nitric oxide 생성에 미치는 영향

AGE가 LPS로 활성화된 대식세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 AGE 농도를 20, 50, 100 µg/ml로 하여 NO를 측정하였다 (Fig. 2). LPS에 의해 활성화된 대식세포는 대조군에 비해 90배의 NO를 생성하였다. 여기에 AGE를 농도별로 처리하였을 때, 농도가 증가할수록 유의성 있게 nitrite의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 AGE 100 µg/ml를 처리하였을 때 유의성이 있게 73%의 NO생성을 억제하였다.

3. RAW264.7 세포의 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향

참당귀 에탄올 추출물이 NO의 생성을 억제시키는 기전을 알아보기 위하여 LPS로 활성화 시킨 대식세포에서의 iNOS의 발현을 mRNA level에서 확인하여 보았다. LPS로 활성화 시킨 대식세포에서 AGE를 20, 50, 100 µg/ml로 하여 처리한

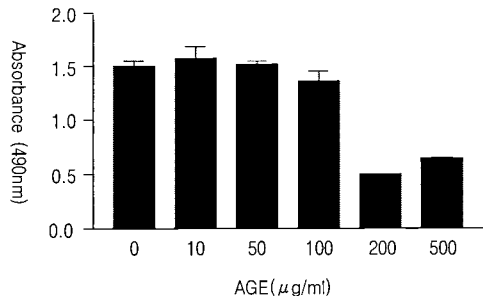


Fig. 1. Dose response of AGE on the proliferation of RAW 264.7 macrophage cells. RAW 264.7 cells were cultured with several concentrations of AGE for 48 h. Results are expressed as mean ± S.D. in triplicate cultures.

후, 14시간 후 mRNA를 분리하여 RT-PCR을 통해 iNOS 유전자 발현의 변화를 살펴보았다 (Fig. 3). 그 결과로 LPS를 처리하지 않은 세포에서는 세포에서의 iNOS의 발현이 나타나지 않았으나, LPS로 활성화된 대식세포에서 iNOS의 발현이 크게 유도되었다. iNOS의 발현은 AGE의 양이 증가할수록 iNOS의 발현에 감소가 일어나는 것으로 나타났다.

4. RAW264.7 세포의 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

NO생성 억제기전에 대한 iNOS protein level에서의 관련성을 조사하기 위하여 Western blot analysis를 이용하여 세포질내의 iNOS 단백질의

발현양을 조사하였다. LPS를 처리하지 않은 세포에서는 iNOS의 단백질 발현이 나타나지 않은 반면에, LPS에 의하여 대식세포내의 iNOS 단백질은 강하게 유도되었으며, AGE의 농도가 증가할수록 iNOS의 발현이 감소하는 것으로 나타났다. iNOS의 발현은 최고 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 많이 억제되었다 (Fig. 4).

5. RAW264.7 세포의 NF- κ B 활성도에 미치는 영향

염증반응을 일으키는데 관여하는 여러 가지 mediator의 유전자발현에 NF- κ B가 주로 관여하며 그 중의 하나인 iNOS유전자도 NF- κ B가 관여함이 알려져 있다. 따라서 LPS에 의해서 활성화

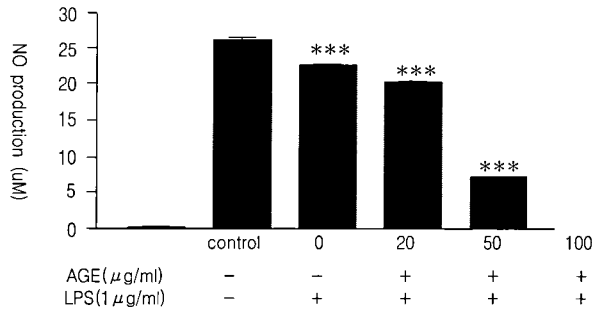


Fig. 2. Effect of AGE on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. RAW 264.7 cells were incubated with or without lipopolysaccharide (LPS; 1 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h in the presence or absence of AGE at indicated doses. The amount of NO released by cells was measured by the method of griess. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. Star marker on the top of the line indicated a significant difference ($p < 0.05$).

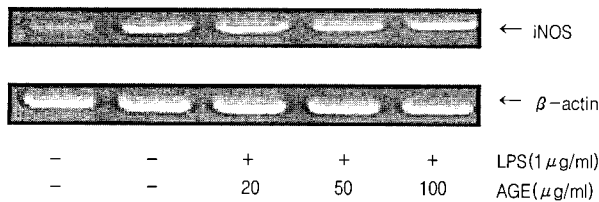


Fig. 3. The effects of AGE on the iNOS mRNA level in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of AGE for 30 min before incubation with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 14 h. Total RNAs were isolated and iNOS mRNA expression was determined by RT-PCR.

된 iNOS가 당귀에 의해서 억제되는 기전을 확인하고자 Western blot analysis를 이용하여 NF-κB 활성을 조사하였다. LPS로 활성화 시킨 대식세포에서 AGE를 100 μg/ml로 하여 처리한 후, 10분 동안 IκB 단백질 발현의 변화를 살펴보았다 (Fig. 5). 그 결과로 LPS에 의해 자극을 받은 대식세포에서는 NF-κB의 활성이 유도되면서 IκB 단백질이 감소하였고 AGE를 처리하였을 때 IκB의 단백질 발현은 LPS로 활성화 시키지 않은 세포에서의 IκB의 발현과 유사하게 나타났다.

고 찰

염증(inflammation)은 조직의 변질과 증식, 순환장애와 삼출 등을 유발하는 복잡한 병변으로, 여러 형태의 감염 또는 자극적 생체 내 대사산물에 대한 생체 내 방어기전의 발현이다²²⁻²³. 靈樞·癰疽篇에는 염증에 대한 병리학적 기전을 寒邪

가 經絡 가운데 침입하면 혈액이 凝滯되고 통하지 않게 되어 癰腫을 일으키고, 寒邪가 변화하면 열이 나고 열이 勝하면 肌肉이 상하고 膿이 생긴다고 설명하고 있다²⁴.

當歸는 산형과에 속하는 참당귀의 뿌리이며, 일당귀와 중국당귀가 함께 유통되고 있다. 當歸는 분류학적으로 참당귀와 일당귀가 비슷하지만, 분자유전자학적으로는 중국당귀와 다르다²⁵.

當歸에 대한 기존의 연구를 살펴보면, 當歸의 추출물은 정상 적혈구에서 응집과 변형 및 삼투압에 의한 용혈에 대한 영향을 연구한 결과, 적혈구의 유동성에 긍정적으로 작용하며 심혈관계에도 유효하였다²⁶. 當歸의 추출물과 정유성분은 적출심장에 대하여 수축력을 저하시키며 항부정맥 효과가 있었다²⁷. 홍화화 當歸 및 익모초로 구성된 처방의 추출물은 마우스의 자궁근을 자극하였다²³. 중국당귀의 정유성분은 급성, 만성 염증 동물모델에서 진통효과 뿐 아니라 항염효과도 보고되었다²⁹.

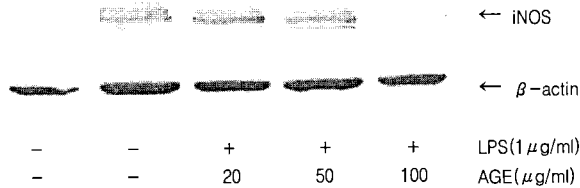


Fig. 4. The effects of AGE on the iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The level of iNOS protein was monitored 24 h after treatment of cells with LPS (1 μg/ml), with or without AGE. Cell lysates were then prepared and subjected to immunoblotting using an antibody specific for murine iNOS.

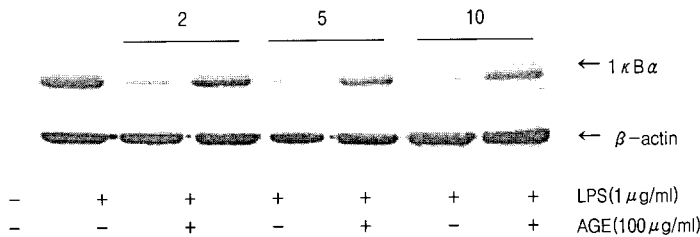


Fig. 5. Inhibition of LPS-inducible NF-κB activation and IκBα degradation by AGE (100 μg/ml) in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with AGE for 30 min before stimulation with LPS (1 μg/ml) for 10 min. The protein levels of IκBα and β-actin in cellular extracts was determined by a Western blot analysis.

그러나 當歸의 항염작용에 대한 분자적 기전은 알려져 있지 않다. 따라서 본 저자들은 RAW 264.7 세포를 이용하여 당귀가 NF- κ B활성을 저하시키고 iNOS의 발현을 억제하여 NO의 생성을 줄일 수 있는지를 평가해서 當歸의 항염작용의 기전을 살펴보았다.

Nitric Oxide 는 세가지 주요한 NOS isoform인 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS)에 의해 arginine으로부터 생성되는 자유라디칼이며, 특히 iNOS의 경우 interleukin, interferon, LPS와 같은 염증성 자극에 의해 조절된다. 체내에서 소량으로 생성되는 NO의 경우 혈관확장, 신경전달, 병원체에 대한 세포 파괴 등과 같은 정상적인 생리기능을 담당하지만, 대식세포에서 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히고, 염증성 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 NF- κ B를 활성화시켜, 염증반응과 자가 면역 관련 질환과 관련되어 있다³⁰⁻³²). NO는 혈관확장 및 조직손상에 주로 관여되어 있다¹⁰⁻¹⁵). 또한 NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하며, 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되고, 특히 대식세포가 interferon- γ (IFN- γ) 또는 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응 매개물질의 역할을 하게 된다¹⁶⁻²⁰). 다량의 생성된 NO는 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다²¹). 그러므로 iNOS 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제시킬 수 있다.

본 실험에서 RAW264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향은 AGE의 농도가 증가할수록 유의하게 nitrite의 생성을 억제하고, AGE 100 μ g/ml를 처리하였을 때 유의성이 있게 73%의 NO생성을 억제하였다. 이는 에탄올을 이용하여 추출된 참당귀 성분이 LPS로 활성화된 대식세포의 NO생성을 억제한다고 보여지며, 이는 농도에 비례하여 NO생

성을 억제한다고 할 수 있다. 그러므로 NO의 생성에 의해 발생되어지는 염증반응과 자가 면역 관련 질환에 참당귀 에탄올 추출물이 NO의 생성을 억제시켜 질환을 완화시키는데 도움이 될 것이다.

대식세포는 일반적으로 외부 침입자에 대항해 식균작용 등을 통해 신체를 방어한다고 알려져 있으며 산화적 스트레스 상황에서 cytokine, interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, nitric oxide, prostaglandins 등을 생성하는 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 몇몇 연구에서는 염증 발생 시 대식세포에 iNOS의 발현이 NO의 생성에 영향을 미친다고 보고되었다³³). LPS는 Gram 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역세포 등을 자극하여 NO생성을 증가 시킨다³⁴).

본 실험에서 LPS를 처리하지 않은 세포에서는 iNOS의 발현이 나타나지 않았고, LPS로 활성화된 대식세포에서 iNOS의 발현이 크게 유도되었고, AGE의 양이 증가할수록 iNOS의 발현에 감소가 일어나는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 LPS로 활성화 시킨 대식세포에서 AGE 추출물이 농도 의존적으로 iNOS발현을 억제한다고 할 수 있다.

RAW264.7 세포의 iNOS 단백질 발현의 본 실험에서 LPS를 처리하지 않은 세포에서는 iNOS의 단백질 발현이 나타나지 않고, LPS로 활성화된 대식세포내의 iNOS 단백질은 강하게 유도되었다. AGE의 농도가 증가할수록 iNOS의 발현이 감소하는 것으로 나타나며 iNOS의 발현은 최고 농도에서 가장 많이 억제되었다. 이러한 결과들로 볼 때, LPS로 활성화 시킨 대식세포에서 AGE에 의해 농도 의존적으로 iNOS의 유전자 발현과 단백질 발현을 억제하며, 이는 Nitric Oxide의 생성에도 영향을 미친다.

NO의 생성 기전을 보면 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-arginine으로부터 NO를 생성하

며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. iNOS의 발현은 NF- κ B 활성화로 유도되며 이는 대식세포에서 LPS나 cytokine에 의해 염증성 매개물들이 과잉 생산되는 중요한 매커니즘이다³⁵⁻⁴⁰. 따라서 참당귀 에탄올 추출물은 cytokine 등에 의해 iNOS의 발현으로 생성되는 NO의 생성을 iNOS 유전자 발현과 iNOS 단백질 억제를 통해 NO의 생산을 억제하는 항염증제로서의 기능을 할 수 있을 것이다.

Nuclear factor κ B (NF- κ B)는 염증반응, 면역반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하는 전사인자로 종양형성, 자가면역질환, 염증질환에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. NF- κ B는 세포질 속에 p50과 p65의 heterodimer와 저해 단백질인 I κ B와 함께 불활성형으로 존재하다 활성화 산소종, LPS, cytokine 같은 염증성 자극에 의해 I κ B kinase가 활성화 되어 I κ B가 분해되면, NF- κ B는 활성화된 후 핵으로 이동하여 iNOS와 COX-2 등의 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시켜 염증반응에 관여하는 nitric oxide (NO), PGE2의 반응성 물질을 생성하게 하여 염증반응을 일으킨다⁷⁻¹¹).

RAW264.7 세포의 NF- κ B 활성화도에 관한 본 실험에서 LPS에 의해 자극을 받은 대식세포에서는 NF- κ B의 활성이 유도되면서 I κ B단백질이 감소하게 되는데, I κ B와 분리된 NF- κ B heterodimer 또는 homodimer는 이후 핵 내로 이동하게 되고, 특정 유전자의 κ B site에 결합하여 유전자 전사인자로서 작용하게 된다. 그러나 여기에 AGE를 처리하면, I κ B의 단백질 발현은 LPS로 활성화 시키지 않은 세포에서의 I κ B의 발현과 유사하게 나타난다. 이는 LPS로 NF- κ B의 활성이 유도되었으나, 참당귀 에탄올 추출물의 성분에서 NF- κ B의 활성을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

본 실험에서는 비록 일당귀와 중국당귀를 시료로 사용하지 않았지만, 참당귀 및 일당귀와 중국

당귀에는 ligustilide와 ferulic acid가 공통 성분이며 그 함량에는 서로 차이가 있는데, 중국당귀가 가장 많은 양을 함유하고 있으므로 이를 모두 시료로 사용하여 그 특성을 비교하는 것은 가치 있는 연구테마일 것으로 사료된다.

본 실험에서는 참당귀 에탄올 추출물에 의한 대식세포에서의 항염 작용을 알아보기 위하여, 대식세포에서 LPS로 염증반응을 유도하였으며, 염증반응과 관련된 iNOS 유전자 발현의 억제에 의한 NO생성 억제를 확인하고자 하였다. 앞으로의 연구는 이러한 결과를 바탕으로 당귀의 고유한 작용기전을 밝히고, 기존의 양약과 염증 호전도에 대한 객관적 약효를 비교할 것이다.

염증반응을 매개하는 주요 효소로서 COX-2와 iNOS를 예로 들 수 있으며, 이들을 억제하는 물질은 항염증제로서 적용 될 수 있다. 또한 천연물은 질병의 치료 및 경감을 위한 의약품의 원료 및 선도 물질의 제공원인으로서 중요한 역할을 한다. 따라서 천연물에서 이들 효소들을 억제하여 항염증 작용을 나타내고 또한 이들 효소와 관련된 여러 biomarker들에 작용하는 기전을 통하여 항염증제로 적용할 수 있는 물질들을 찾기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서 염증에 관여하는 중요한 요소인 NO의 생성을 NF- κ B신호 전달 경로에서 억제하는 참당귀 에탄올 추출물은 항염증 치료제로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

결론

한의학적으로 補血調經, 活血止痛등의 효능이 있는 참당귀의 항염 효과를 검토하기 위해 RAW 264.7세포에 LPS를 처리하여 염증매개체의 분비량 및 발현을 측정하고 그 억제 작용기전을 밝히기 위해 NF- κ B활성도를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

첫째, NO의 분비량은 참당귀 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었고 처리군

100 µg/ml에서 73%의 억제율을 보였다.

둘째, iNOS의 mRNA와 protein 발현이 참당귀 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

셋째, LPS로 유도된 RAW264.7 세포의 NF-κB 활성화는 참당귀 에탄올추출물에 의해 억제됨을 확인할수 있었다. 이상의 결과는 當歸 에탄올추출물이 항염증 효과가 있음을 설명해주고, 과량의 염증성 매개물 생성과 관련된 염증성 질환의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. 육창수, 안덕균, 현대본초학, 고문사, 1973:158.
2. 송주택, 식물대도감, 서울, 1989.
3. 류경수, 육창수, 참당귀근의 coumarine성분에 관한 연구, 약학회지, 1967;11:33-35.
4. Ozaki Y. Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1992;40:954-956.
5. Kim JH, Jeong JH, Jeon ST et al. Decursin inhibits induction of inflammatory mediators by blocking nuclear factor-kappaB activation in macrophages. Mol Pharmacol. 2006;69:1738-1790.
6. Choi YE, Ahn H, Ryu JH. Polyacetylenes from *angelica gigas* and their inhibitory activity on nitric oxide synthesis in activated macrophages. Biol Pharm Bull. 2000;23:884-886.
7. Fox JB, Doerr RC, Lakritz L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. J Assoc Off Anal Chem. 1982;3:690-5.
8. Ito T. and Ikeda U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. Curr Drug Target Inflamm Allergy. 2003;2(3):257-265.
9. Bartus' VV, Talaieva TV, et al. The role of a systemic inflammatory process in the atherogenic modification of lipoproteins and the development of hypercholesterolemia. Fiziol Zh. 1999;45(1~2):40-49.
10. Lawrence T, Gilroy DW, et al., possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. Nat Med. 2001;7:1291-1297.
11. Riehemann K, Behnke B, Schultz-Osthoff K. Plant extracts from sting nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-κB. FEBS Lett. 1999;442:89-94.
12. Baeuerle R, Henkel T. Function and activation of NF-κB in the immun system. Annu Rev Immunol. 1994;12:141-179.
13. Allenm R, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med. 2000;28:463-499.
14. Gius D, Botero A, Shah S, et al. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-κB and AP-1. Toxicol Lett. 1999;106:93-106.
15. Jin HZ, Lee JH, Lee D, Hong YS, Kim YH, Lee JJ. Inhibitors of the LPS-induced NF-kappaB activation from *Artemisia sylvatica*. Phytochemistry. 2004 65;2247-2253.
16. Miyasaka N, and Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. Life Sci. 1997;61:2073-2081.
17. Kim SJ, Jeong HJ, Moon PD, et al. Anti-inflammatory activity of gumiganghwaltang through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in peritoneal macrophages. Biol Pharm Bull. 2005;28:233-237.
18. Wang Y, Vodavotz Y, Kim PK, Zamora R, and Billiar TR. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. Ann N Y Acad Sci. 2002;962:415-422.

19. Ronchetti D, Impagnatiello F, Guzzetta M, et al. Modulation of iNOS expression by a nitric oxide-releasing derivative of the natural antioxidant ferulic acid in activated RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2006; 532:162-169.
20. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, and Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282:1075-1079.
21. Helmer KS, Chang L, Cui Y, Mercer DW. Induction of NF-kappaB, IkappaB-alpha, and iNOS in rat gastric mucosa during endotoxemia. *J Surg Res.* 2002;104:46-52.
22. 유태무, 이숙영, 정수연, 송상애, 류항목, 이은방, 양지선. studies on the antiinflammatory effects of natyral products. *응용약물학회지.* 1998;6:269-275.
23. 박희준, 이제현, 김수영, 심범상, 구현중, 강전모, 최일환, 이재동, 김남재, 이지숙, 임사비나. 고량강의 항염증 작용에 대한 연구. *대한본초학회지.* 2005;20:43-53.
24. 홍원식 편, 정교황제내경(영추), 동양의학연구원출판부, 서울, 1985:345-350.
25. Zhao KJ, Dong TT, Tu PF, et al. Molecular genetic and chemical assessment of radix *Angelica* (*Danggui*) in China. *J Agric Food Chem.* 2003;51:2576-2583.
26. Ryu JH, Yook CS. The effects of Sa-Mul-Tang (Si-Wu- Tang). A traditional chinese medicine, on phenylhydrazine-induced anemic rats. *J. Appl. Pharmacol.* 2001;9:1-6.
27. 한방약리학 교재편찬위원회, 한방약리학, 신일상사, 2005:339
28. Shi M, Chang L, He G. Stimulating action of *Carthamus tinctorius* L. *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and *Leonurus sibiricus* L. on the uterus. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 1995;20: 173-175.
29. Liu L, Jia M, Mei Q, Yang T, Wang Q. Anti-inflammatory and analgesic actions of essential oil extracted from radix *Angelica sinensis* by ethanol. *China Pharmacy.* 2002;13: 526-527.
30. Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, et al. Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension.* 2000;18:1833-1840.
31. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288:31-36.
32. Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol.* 1996;9:821-827.
33. Bureny S, Tamir V, Gal A, et al. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. *Nitric Oxide.* 1997;1:130-144.
34. Spitzer JA. Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology.* 1994;19:214-228.
35. Oshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory process as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994;305: 253-264.
36. Mordan LJ, Burnett TS, Zhang LX et al. Inhibitors of endogenous nitrogen oxide formation block the promotion of neoplastic transformation in C3H10T1/2 fibroblasts. *Carcinogenesis.* 1993;14:1555-1559.
37. Shapira L, Soskolne WA, Houry Y, et al. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect Immun.* 1996;64:

- 825-828.
38. De Plaen IG, Qu XW, Wang H, et al. Endotoxin, but not platelet-activating factor, activates nuclear factor-kappaB and increases IkappaBalpha and IkappaBbeta turnover in enterocytes. *Immunology*. 2002;106:577-583.
39. Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, et al. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*. 2003;278:26480-26487.
40. Marzocco S, Di Paola R, Ribocco MT, et al. Effect of methylguanidine in a model of septic shock induced by LPS. *Free Radic Res*. 2004; 38:1143-1153.